

组织工程支架材料丝素蛋白研究进展

胡焯婷 王新刚 俞晓波 韩春茂

组织工程支架作为 ECM 的人工模拟物,其设计原则之一是尽可能地模拟天然 ECM 的精细结构及成分^[1]。因此,支架的构建材料及制备方法的选择显得尤其重要。目前,可用于组织工程支架构建的材料主要包括人工合成的高分子聚合材料和天然来源的生物大分子蛋白。前者尽管具有良好的可塑性、可控的降解速率和优良的机械性能,但往往缺乏生物模拟信号和细胞亲和性;天然来源的生物材料则具有良好的生物相容性和亲水性,是构建组织工程支架的理想材料之一。丝素蛋白(silk fibroin, SF)是一种较佳的天然生物材料,安全无毒、无刺激性,且具有独特的机械性能和良好的生物学活性,不但可以单独用于组织工程支架的构建,还可与其他生物材料联用构建各种支架,广泛应用于皮肤、神经、血管、骨及软骨组织工程领域。本文就 SF 作为组织工程支架材料在组织工程与再生医学领域的研究现状作一综述。

1 SF 的特性

天然蚕丝结构是由核心的 SF 和外围的丝胶组成。由于丝胶具有一定毒害作用,容易引起生物体自身的超敏反应,而用于组织工程的蚕丝材料是经脱丝胶处理的 SF,故具有良好的生物安全性及优良的生物学性能^[2-3],几乎不会引起生物体明显炎症反应^[4]。SF 主要由高度重复序列组成的短侧链氨基酸(如甘氨酸和丙氨酸)和带电长侧链氨基酸组成的复杂疏水区构成。这些疏水区易通过氢键和疏水作用形成 β 折叠和晶体^[5],晶体区富含丙氨酸或丙氨酸-甘氨酸重复序列,这种结构使 SF 具有一定力学稳定性。基于具有众多的氢键、疏水键和结晶区,SF 相比胶原、聚乳酸等其他材料而言有更优良的力度和韧度,甚至优于肌腱和骨。因此,SF 优良的柔

韧性和抗拉伸强度可能是其区别于其他天然生物材料的显著特征之一。另外,SF 对氧气和水具有良好的通透性,可缓慢发挥生物降解作用,且降解速率因支架的设计及表面修饰类型不同而各异^[6]。

2 SF 的应用形式

基于制备 SF 的各种生物材料表现形式不同,SF 主要分为两大类,即单纯型和复合型。相比较而言,单纯型 SF 支架制备方便,形态多样,如多孔状、膜状、纤维状、管状等。但在某些情况下,其单一成分及性能难以满足特殊组织细胞培养的需要及支架材料的结构要求,应用受到一定限制。因此,将 SF 与其他合成材料制备成各种复合型支架,可以获得理化性能和生物学性能更加优良的支架类型,例如某种形式的 SF 可以与壳聚糖^[7]、藻酸盐、胶原^[8]、透明质酸^[9]、羟基磷灰石、聚乳酸^[10]、聚己内酯^[11]等进行整合,且这一复合性应用已成为构建 SF 基支架的重要方向之一。

3 SF 基支架的应用领域

3.1 SF 基支架在皮肤组织工程中的应用

各种大面积深度皮肤损伤目前通常采用自体、异体或异种皮片移植修复,虽然效果良好,但由于对供体的二次损伤加上来源的限制,在实际临床应用中往往存在一定局限性。目前科学家尝试研制人工材料替代皮肤组织,众多实践已证明 SF 材料对皮肤组织再生有良好的生物相容性。近几年来,关于 SF 生物材料在皮肤组织工程中的应用研究取得了很大进展。Guan 等^[12]将冻干法制备的多孔 SF 基支架(porous silk fibroin scaffold, PSFS)植入 SD 大鼠皮肤中,在胶原基质沉积、皮肤再生、炎性细胞浸润和血管再生等 4 个方面与聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)海绵支架进行半定量对比,观察到胶原基质在 PSFS 中比在 PVA 海绵支架中沉积得更早更快,PSFS 植入后炎性细胞浸润更少,新生皮肤组织生长更快。提示 PSFS 的自我降解速率与皮肤组织生长速率较为协调,且具有良好的生物相容性,在皮肤再生中可发挥一定潜能。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.04.017

基金项目:浙江省重大科技专项(优先主题)社会发展项目(2007C13040)

作者单位:310009 杭州,浙江大学医学院附属第二医院烧伤科

通信作者:韩春茂,Email:hanchunmao1@126.com,电话:0571-

87784585

Chung 和 Chang^[13] 分别于 SF/壳聚糖-透明质酸 (CS-HA) 复合支架和单纯 SF 支架中植入人类皮肤成纤维细胞 (human dermal fibroblast, HDF), 观察到 HDF 在 2 种支架中均能良好增殖, 但在 SF/CS-HA 复合支架中 HDF 密度更大; 葡萄糖消耗量和乳糖生成量检测结果也表明 HDF 在复合支架中增殖更为旺盛, 提示 SF 与其他材料复合后能改善自身性能, 更适用于皮肤组织工程。另外, Altman 等^[7] 首次报道以体积比 75:25 混合 SF 和壳聚糖获得复合支架, 他们将脂肪干细胞 (adipose-derived stem cell, ASC) 预先植入该支架后移植于鼠创伤模型表皮下, 观察到 ASC 能分化为 Fb、血管和上皮细胞, 可促进皮肤伤口愈合。Jeong 等^[14] 的研究表明, 将静电纺丝技术制备的丝素纳米纤维经氧-血浆处理后, 其亲水性加强, 可增强人体表皮角质细胞和 Fb 活性。Okabayashi 等^[15] 首次提出极化羟基磷灰石 (polarized hydroxylapatite)/SF 支架可以促进 Fb 生长, 有利于皮肤创伤的修复。

Liu 等^[3] 的研究证明, SF 膜对小鼠 Fb 细胞株 L929 无毒性, 并且对细胞黏附、细胞周期和细胞凋亡均无不良影响; SF 膜对人脐静脉内皮细胞株 ECV304 分泌血管内皮生长因子 (VEGF) 和人二倍体细胞株 WI-38 分泌 VEGF、血管生成素 1、血小板源性生长因子及成纤维细胞生长因子 2 均无影响, 为 SF 的临床应用提供了一定参考。

3.2 SF 基支架在神经组织工程中的应用

神经组织缺损长度较大时, 往往难以通过外科手术手段将其断端吻合, 采用移植自体神经的方法亦存在来源受限等问题。基于 SF 在皮肤组织修复等领域中的作用日益凸显, 不少研究人员开始探索 SF 在神经组织工程中的应用。Yang 等^[16] 探究了 SF 在外周神经组织中的生物相容性, 观察到 SF 与施旺细胞 (Schwann cell) 有良好的组织相容性, 无毒性反应, 能支持大鼠背根神经节细胞生长; 另外, Tang 等^[17] 评价了 SF 在中枢神经系统中的生物相容性, 观察到海马神经元细胞在 SF 基质中生长, 无明显毒性作用和不良反应, 组织相容性良好。这 2 项研究为 SF 在神经组织工程修复中的应用提供了实验依据。Yang 等^[18] 尝试将 SF-神经引导导管作为“桥梁”植入大鼠坐骨神经缺损处, 6 个月后果区运动功能开始缓慢恢复, 且相应支配的肌肉萎缩程度比自体神经移植部位的肌肉萎缩程度轻, 证实 SF 基支架在修复外周神经损伤中具有一定可行性。单纯的人工神经导管缺乏分子和结构功能, 不能恢复神经组织

的正常生理功能。近年来, Madduri 等^[19] 将胶质细胞神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 负载到 SF 人工神经导管上, 并用于培育鸡胚背根感觉神经元和脊髓运动神经元, 4 周后能检测到具有活性的 GDNF 和 NGF, 提示 SF 基支架可以支持神经元细胞表达生长因子。

3.3 SF 基支架在血管组织工程中的应用

随着研究的不断深入和拓展, SF 开始被用于组织工程血管构建并展示出喜人前景。目前研究表明血管内皮细胞与 SF 基支架有良好的组织相容性^[10,20]。血管组织工程修复的关键性问题包括血管组织材料能否经受长期高压血流冲击及功能性内皮细胞能否长入并生长。Zhang 等^[21] 在 SF 基支架内腔表面连续植入入冠状动脉平滑肌细胞和人动脉内皮细胞, 并在生理搏动流动状态下培养, 观察到 SF 可促进 ECM 生成及组织形成, 同时可保留分化细胞的基因, 且形成的仿内皮基底膜在生理剪切力的作用下可以有效保持完整的内皮层和中膜层, 提示该种管状支架在实际应用中具有一定可行性。Marelli 等^[22] 利用静电纺丝技术制备 SF 管状结构支架, 经力学测定获知该小管可承受压力是正常生理值上限 (120 mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa) 的 4 倍, 比病理值上限 (180 ~ 220 mm Hg) 约高出 2 倍, 表明 SF 小管在理论上具有适宜血管移植的良好机械性能以及抵抗血流冲击的潜能。Enomoto 等^[23] 将 SF 小管植入体内后观察到有血管样结构形成, 提示该种支架可以作为长期小管径血管移植。

3.4 SF 基支架在骨组织工程中的应用

人工材料在骨组织工程中有良好的应用前景。目前, 骨组织工程修复的主要问题之一在于使构建的再生骨组织具有良好的生理性能, 改善新生骨稳定性。Rockwood 等^[24] 在体外将 SF 颗粒与人体骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 基质以干质量比 2:1 培养后, 观察到随着 SF 颗粒的增加, MSC 的骨化能力增强, 提示适度增加支架的刚强度可以促进新生骨形成。Zhang 等^[25] 探究了 4 种不同孔径 SF 支架对成骨的影响, 结果表明孔径范围在 100 ~ 300 μm 的支架较孔径 50 ~ 100 μm 者更有利于 MSC 的分化及 ECM 分泌。Jiang 等^[26] 将骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2) 基因修饰的 MSC 种入预先矿化的 SF 基支架, 也观察到该支架可以促使新骨生成及成熟。Kim 等^[27] 报道, SF 可以改变人骨肉瘤细胞株 MG-63 的基因表达, 通过

RT-PCR 和蛋白质印迹法证实碱性磷酸激酶和 I 型 $\alpha 1$ 胶原、纤维连接蛋白和 TGF- β_1 表达显著升高,提示控制 SF 的降解也可以加速新骨形成。Wang 等^[28]的研究表明,在羟基磷灰石/SF 复合物上种植兔 MSC 能促进骨损处愈合;Mieszawska 等^[29]报道,在 SF 薄膜中加入二氧化硅可以调控人 MSC 基因表达,并导致骨涎蛋白和 I 型胶原表达上调,表明通过有效调控有机物和无机物的降解-重建速率,可以为 SF 基支架诱导骨再生创造良好环境。

Nagano 等^[30]报道,转基因蚕产生的转基因 SF 包含更多多聚谷氨酸位点,对结合钙有更高的活性,相比传统的 SF 更有利于骨损伤处新骨形成和矿化。

3.5 SF 基支架在软骨组织工程中的应用

人类关节软骨周围的细胞密度比较低,基质更新速率较为缓慢,同时也缺乏血供系统,一旦受损难以再生,往往形成纤维化组织。当前软骨组织损伤治疗大多局限于软骨功能的恢复并需长期维持治疗,疗效十分有限。三维多孔 SF 基支架良好的机械性能、生物相容性和细胞黏附性有利于软骨组织再生。Cheon 等^[31]将 SF 和羊毛角质成分(wool keratose, WK)用盐滤除法处理后行静电纺丝处理,初步得到纳米级的 SF/WK 支架,再经微波诱导的氩血浆系统处理后得到改良型支架。经观察获知改良型支架更有利于膝关节软骨细胞的黏附和增殖,并能促进葡糖胺聚糖等 ECM 的分泌。提示氩血浆系统处理后的 SF/WK 支架比未经此处理的 SF/WK 支架更有利于软骨再生。Kambe 等^[32]的研究显示,含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸重复序列的转基因 SF 支架促进软骨细胞黏附的同时,不改变软骨细胞的基因型,且可促进软骨再生。Makaya 等^[33]报道,与普通盐滤除法制备的 SF 复合支架比较,经六氟异丙醇溶解后再加入蔗糖颗粒所制成的 SF 复合支架孔径更小,形态具有一定的可变性,更适宜软骨细胞基质沉积,且其自我降解速率相对较缓慢,提示蔗糖-六氟异丙醇复合支架更能适应软骨细胞再生的需求。

另外, SF 基支架还可用于组织工程鼓膜^[34]、心肌组织^[35]、肌腱和韧带^[36]、腹壁缺损^[37]等的修复。

4 前景与展望

综上所述, SF 具有良好的生物相容性、优良的机械性能、多变的可塑性,在组织工程支架的构建方面有着较为广阔的应用前景。尤其是在构建具有良好机械强度的支架方面,由 SF 构建的三维多孔支架

或者纤维支架具有支持各种类型细胞的黏附、增殖以及分化所需的机械性能,甚至在体内发挥诱导组织再生及功能化的作用。所有这些研究为进一步了解 SF 材料的生物学性能及实现临床转化提供了宝贵的经验及数据支持。

SF 材料在组织工程中的应用要实现“从实验室到临床”的转化,还有待进一步探究,例如:(1) SF 与皮肤组织具有良好的生物相容性,但其自身降解需要一定时间,植入体内后可能会影响正常组织的生成。能否使 SF 降解速率和正常组织生成速率保持协调同步,可能是 SF 材料能否成功应用的关键及后续研究的重点之一。(2) SF 基支架作为一种血管移植替代物具有良好的生物相容性和优良的机械性能,且体外形成的血管移植入体内也具有功能,但是关于 SF 管状支架是否会影响血栓形成还缺乏相应的研究,有待进一步评价。(3) SF 在骨组织工程方面的应用研究较为成熟,已解决组织相容性及生物机械性能等难题,但是众多研究均以促进骨生长为目的改善支架的结构,并未评价再生骨的长期性能。(4) 当前 SF 研究大多局限于动物实验,其结论不一定适用于人体,还有待进一步研究加以明确。

参考文献

- [1] 王新刚,于玮洁,韩春茂. 真皮组织微观化重建与组织工程支架三维结构关系研究进展. 中华烧伤杂志, 2010, 26(4): 292-295.
- [2] Santin M, Motta A, Freddi G, et al. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. J Biomed Mater Res, 1999, 46(3): 382-389.
- [3] Liu TL, Miao JC, Sheng WH, et al. Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(1): 10-16.
- [4] Kim KH, Jeong L, Park HN, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. J Biotechnol, 2005, 120(3): 327-339.
- [5] Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, et al. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. Biomaterials, 2006, 27(36): 6064-6082.
- [6] Etienne O, Schneider A, Kluge JA, et al. Soft tissue augmentation using silk gels: an in vitro and in vivo study. J Periodontol, 2009, 80(11): 1852-1858.
- [7] Altman AM, Yan Y, Matthias N, et al. IFATS collection; human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. Stem Cells, 2009, 27(1): 250-258.
- [8] Zhou J, Cao C, Ma X, et al. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering. Int J Biol Macromol, 2010, 47(4): 514-519.
- [9] Ren YJ, Zhou ZY, Liu BF, et al. Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold. Int J Biol Macromol, 2009, 44(4): 372-378.
- [10] Wang S, Zhang Y, Wang H, et al. Fabrication and properties of the electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular

- scaffold. *Biomacromolecules*, 2009,10(8):2240-2244.
- [11] Wang CY, Zhang KH, Fan CY, et al. Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater*, 2011,7(2):634-643.
- [12] Guan G, Bai L, Zuo B, et al. Promoted dermis healing from full-thickness skin defect by porous silk fibroin scaffolds (PSFSs). *Biomed Mater Eng*, 2010,20(5):295-308.
- [13] Chung TW, Chang YL. Silk fibroin/chitosan-hyaluronic acid versus silk fibroin scaffolds for tissue engineering: promoting cell proliferations in vitro. *J Mater Sci Mater Med*, 2010, 21(4):1343-1351.
- [14] Jeong L, Yeo IS, Kim HN, et al. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration. *Int J Biol Macromol*, 2009,44(3):222-228.
- [15] Okabayashi R, Nakamura M, Okabayashi T, et al. Efficacy of polarized hydroxyapatite and silk fibroin composite dressing gel on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009,90(2):641-646.
- [16] Yang Y, Chen X, Ding F, et al. Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials*, 2007,28(9):1643-1652.
- [17] Tang X, Ding F, Yang Y, et al. Evaluation on in vitro biocompatibility of silk fibroin-based biomaterials with primarily cultured hippocampal neurons. *J Biomed Mater Res A*, 2009,91(1):166-174.
- [18] Yang Y, Ding F, Wu J, et al. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2007,28(36):5526-5535.
- [19] Madduri S, Papaloizos M, Gander B. Trophically and topographically functionalized silk fibroin nerve conduits for guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 2010,31(8):2323-2334.
- [20] Soffer L, Wang X, Zhang X, et al. Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008,19(5):653-664.
- [21] Zhang X, Wang X, Keshav V, et al. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials*, 2009,30(19):3213-3223.
- [22] Marelli B, Alessandrino A, Farè S, et al. Compliant electrospun silk fibroin tubes for small vessel bypass grafting. *Acta Biomater*, 2010,6(10):4019-4026.
- [23] Enomoto S, Sumi M, Kajimoto K, et al. Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg*, 2010,51(1):155-164.
- [24] Rockwood DN, Gil ES, Park SH, et al. Ingrowth of human mesenchymal stem cells into porous silk particle reinforced silk composite scaffolds: an in vitro study. *Acta Biomater*, 2011,7(1):144-151.
- [25] Zhang Y, Fan W, Ma Z, et al. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. *Acta Biomater*, 2010,6(8):3021-3028.
- [26] Jiang X, Zhao J, Wang S, et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified hMSCs. *Biomaterials*, 2009,30(27):4522-4532.
- [27] Kim JY, Choi JY, Jeong JH, et al. Low molecular weight silk fibroin increases alkaline phosphatase and type I collagen expression in MG63 cells. *BMB Rep*, 2010,43(1):52-56.
- [28] Wang G, Yang H, Li M, et al. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. *J Bone Joint Surg Br*, 2010,92(2):320-325.
- [29] Mieszawska AJ, Fourligas N, Georgakoudi I, et al. Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials*, 2010,31(34):8902-8910.
- [30] Nagano A, Tanioka Y, Sakurai N, et al. Regeneration of the femoral epicondyle on calcium-binding silk scaffolds developed using transgenic silk fibroin produced by transgenic silkworm. *Acta Biomater*, 2011,7(3):1192-1201.
- [31] Cheon YW, Lee WJ, Baek HS, et al. Enhanced chondrogenic responses of human articular chondrocytes onto silk fibroin/wool keratose scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Artif Organs*, 2010,34(5):384-392.
- [32] Kambe Y, Yamamoto K, Kojima K, et al. Effects of RCDS sequence genetically interfused in the silk fibroin light chain protein on chondrocyte adhesion and cartilage synthesis. *Biomaterials*, 2010,31(29):7503-7511.
- [33] Makaya K, Terada S, Ohgo K, et al. Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. *J Biosci Bioeng*, 2009,108(1):68-75.
- [34] Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, et al. Preliminary results of the application of a silk fibroin scaffold to otology. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010,142(3 Suppl 1):S33-35.
- [35] Yang MC, Wang SS, Chou NK, et al. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches in vitro. *Biomaterials*, 2009,30(22):3757-3765.
- [36] Chen X, Qi YY, Wang LL, et al. Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix. *Biomaterials*, 2008,29(27):3683-3692.
- [37] Horan RL, Bramono DS, Stanley JR, et al. Biological and biomechanical assessment of a long-term bioresorbable silk-derived surgical mesh in an abdominal body wall defect model. *Hernia*, 2009,13(2):189-199.

(收稿日期:2011-05-03)

(本文编辑:罗勤)

· 产品信息 ·

磺胺嘧啶银乳膏及聚乙烯醇凝胶

烧伤创面用药:磺胺嘧啶银乳膏,国药准字:H20094208。瘢痕用药:聚乙烯醇凝胶,批准文号:豫新食药监械(准)字2008第1640156号。招商:区域代理厂商互惠。联系电话:0373-5596211,15893820999,13937389562。

新乡市华信药业有限公司始建于2000年9月,致力于创面外用药和医用高分子材料的研发,主要产品有:磺胺嘧啶银乳膏、凯新银锌霜、银锌霜抗菌巾。原料药:磺胺嘧啶钠(发明专利)、磺胺嘧啶银、磺胺嘧啶锌、凯新银锌粉等。公司以市场为导向,以科技为动力,坚持“产、学、研、用”四结合的科研方针,先后与20多所高校及科研院所建立横向协作关系,聘请20多名专家作技术顾问,为企业技术进步和可持续发展奠定了坚实基础。

新乡市华信药业有限公司